

Vergleichende flammenphotometrische
und komplexometrische Calcium-Bestimmung
in den Knochen wachsender Ratten

Eberhard Schmidt

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Professor Dr. K. Z i p f

VERGLEICHENDE FLAMMENPHOTOMETRISCHE UND
KOMPLEXOMETRISCHE CALCIUM-BESTIMMUNG IN DEN KNOCHEN
WACHSENDER RATTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

von

Eberhard Schmidt
aus Baden-Baden

1959



5349/60

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. Karl Zipf

Referent: Prof. Dr. Karl Zipf

Tag der Promotion: 28.7.1959

"UNI"-Druck, München 13, Amalienstr.85

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
1) Allgemeiner Teil (Literatur)	2
1.1) Flammenphotometrische Calcium-Bestimmung	2
1.2) Chemische Calcium-Bestimmung	3
1.3) Knochen-Calcium-Gehalt wachsender Ratten	4
2) Eigene Untersuchungen	6
2.1) Tiermaterial und Futter	6
2.2) Knochenaufbereitung	6
2.3) Flammenphotometrische Bestimmung	7
2.3.1) Prinzip	7
2.3.2) Reagenzien	7
2.3.3) Lösungen	7
2.3.4) Bestimmung	8
2.3.5) Messung und Berechnung der Ergebnisse	8
2.4) Komplexometrische Methode	9
2.4.1) Prinzip	9
2.4.2) Reagenzien	9
2.4.3) Bestimmung	9
2.4.4) Berechnung	10
3) Ergebnisse	10
4) Diskussion der Methoden und Ergebnisse	27
5) Zusammenfassung	29
6) Literaturverzeichnis	30
Lebenslauf	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

EINLEITUNG

Über den Calcium-Gehalt des Skelettes von Versuchsratten verschiedenen Alters besteht in der Literatur keine Einigkeit. Der Grund hierfür wird nicht zuletzt in den verschiedenen Untersuchungsmethoden gesehen werden müssen.

Durch Untersuchungen mit zwei voneinander unabhängigen Verfahren werden sich methodische Mängel verkleinern lassen. Am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München wurde mir deshalb die Aufgabe gestellt, den Knochen-Calcium-Gehalt wachsender Versuchsratten verschiedenen Alters in Kompakta und Spongiosa flammenphotometrisch und komplexometrisch zu bestimmen und dabei die Leistungsfähigkeit der Methoden zu vergleichen.

1) ALLGEMEINER TEIL (LITERATUR)

1. 1) Calcium-Bestimmungen im Knochen mit Hilfe der Flammenphotometrie sind bisher wenig bekannt geworden.

Die Bestimmung in anderen Medien ergab Störeinflüsse durch Kationen und Anionen.

Die Art der Störung stellt sich als eine Anregung oder Dämpfung der spezifischen Flammenintensität dar.

Als Calcium-störende Kationen sind bekannt: Al(42, 15, 31, 39), Ba (39), Cd (39), Cr (39, 42), Fe (42), K (12, 39), Li (39), Mg (12, 39, 45), Mn (12, 39), Na (39), Si (6), Sr (12, 45), Ti (45), Zn (39).

Nach HERRMANN (13) hängt der Grad des Störeinflusses von der Konzentration des Störelementes, von der Flammentemperatur und damit von den Brenngasen, von deren Mischungsverhältnis, von der Brennerform, von der Art der Einbringung der Substanz in die Flamme, von dem Verdünnungsmittel und von der Calcium-Konzentration selbst, ab. Angaben, von welcher Menge an sich ein Störelement bemerkbar macht, sind wegen des komplexen Charakters der Gesamtstörung also nur von bedingtem Wert. Soviel läßt sich jedoch sagen, daß im Knochen kein störendes Kation in einer Menge vorkommt, die berücksichtigt werden muß.

Als störende Anionen sind in erster Linie Phosphat (20, 35, 46, 40, 44, 12, 24), Sulfat (12, 33, 35) und Arsenat (47) bekannt. Geringere Einflüsse haben: Salzsäure (12), Essigsäure (2), Borsäure (2), Nitrat (2, 12, 35) und Chlorat (2, 45).

Mit Ausnahme des Phosphats kommen alle in so geringen Konzentrationen in Knochen vor, daß sie nicht berücksichtigt werden müssen. Der Phosphatgehalt dagegen beträgt über 50% der Asche (36).

Die Phosphatstörung macht sich als Depression der spezifischen Flammenintensität bemerkbar, die mit steigendem Phosphatgehalt zunimmt. Bei einem Phosphor/Calcium Verhältnis gleich oder größer als 1 : 2 hört die Konzentrationsabhängigkeit innerhalb eines gewissen Bereiches auf (2, 5, 8, 22, 25, 26, 35), um dann bei einem weiteren Anstieg in eine Anregung umzuschlagen (2).

Die Phosphatstörung wird ebenfalls durch die oben angegebenen Variablen beeinflusst (13).

Versuche, den Störeinfluß zu beseitigen oder wenigstens zu verkleinern, sind in der Literatur mannigfach verzeichnet. Hierzu wird im einzelnen empfohlen: Das Parallelverfahren (Messung in dem oben erwähnten, von der Phosphatkonzentration unabhängigen Bereich nach Zugabe von Phosphat zu Eich- und Analysenlösung: 13, 35), die Nachahmmethode (Eichlösung, die das Störelement in derselben Konzentration enthält wie die Analysenlösung: 44, 46). HERRMANN (13) erwähnt zur Ausschaltung der Störung das Pufferverfahren (Pufferung des Phosphateinflusses durch Zugabe eines, dem zu bestimmenden Element, ähnlich gestörten Elementes), das Parameterverfahren (verschiedene Eichlösungen mit dem Störelement als Parameter), das Korrekturverfahren (Haupteichlösung mit mittlerem Gehalt des Störelementes; Korrektur bei großer Differenz zwischen Analysen- und Haupteichlösung), das Sättigungsverfahren (Sättigung von Analysen- und Eichlösung mit dem Störelement), das Verdünnungsverfahren (Verringerung der Störung durch starkes Verdünnen der Analysenlösung), das Zumischverfahren (Zugabe einer bekannten Menge des gesuchten Elementes zur Analyse).

Alle diese Methoden sind mit zum Teil erheblichen Nachteilen behaftet, wie Verschlechterung der unteren Nachweisgrenze, Störmöglichkeiten durch Kationen, Einschleppungsgefahr von Störelementen und großem Arbeitsaufwand. KÖHNLEIN und LÜCKE (22) kommen deshalb zu dem Schluß, daß die flammenphotometrische Calcium-Bestimmung in phosphorhaltigen Medien nur möglich ist, wenn das Phosphat vorher entfernt wird.

Hierzu gibt KICK (19) ein Verfahren an, nach dem Phosphat in Gegenwart von Ammoniumacetat mit Aluminiumchlorid gefällt wird. In jüngster Zeit ist am hiesigen Institut eine Methode zur Bestimmung von Calcium und Strontium speziell im Knochen ausgearbeitet worden (36), wobei das Phosphat durch Fällung mit Eisen-III-chlorid in Gegenwart von Ammoniumacetat aus der Analysenlösung beseitigt wird. Diese Methode wurde bei den vorliegenden Untersuchungen angewendet.

1. 2) Chemische Calcium-Bestimmung

Zur quantitativen, chemischen Calcium-Bestimmung sind folgende Verfahren gebräuchlich:

die gravimetrische Bestimmung:

- a) als Calciumoxyd, das nach Oxalatfällung und Glühen erhalten wird (32),
- b) als Calciumcarbonat nach Ammoniumkarbonatfällung und Erhitzen auf 500°C (32),

- c) als Calciumoxalat nach Fällung mit Ammoniumoxalat (17),
- d) als Calciumsulfat nach Abrauchen mit Schwefelsäure (32),
- e) als Calciummolybdat nach Fällung mit Ammoniummolybdat in neutraler bis schwach ammoniakalischer Lösung (17),
- f) als Calciumwolframat nach Fällung mit Natriumwolframat (18),
- g) als Calciumpikrolonat nach Fällung mit Pikrolonsäure (1, 7, 21, 34),

die titrimetrische Bestimmung:

- a) des Oxalatäquivalentes mit Kaliumpermanganat oder Cer-IV-sulfat (32),
(Diese Methode wird u.a. von KRAMER und TISDALL (23) zur Calcium-Bestimmung in eiweißhaltigen Flüssigkeiten verwendet)
- b) mit Kaliumpalmitat in neutraler Lösung; Phenolphthalein als Indikator (18),
- c) des Carbonatäquivalentes mit Salzsäure nach Oxalatfällung und Glühen (32),
- d) mit Natriumäthylendiamintetraacetat und Murexid als Indikator (4),
(Diese Methode wird neben der flammenphotometrischen bei den folgenden Untersuchungen angewendet. Eine Beschreibung für die spezielle Bestimmung des Knochen-Calciums liegt meines Wissens nicht vor.)

die kolorimetrische Bestimmung:

- a) einer vorgegebenen Menge Eisen-III-rhodanid nach Entfärbung durch Calciumoxalat (28),
- b) nach Oxalatfällung, Überführung in das Carbonat und Zugabe einer definierten Menge Salzsäure, deren nicht umgesetzter Anteil aus einem Jodat-Jodid-Gemisch die entsprechende Menge Jod freimacht. Dieses wird bei 490 m μ kolorimetriert (27).

1.3) Knochen-Calcium-Gehalt wachsender Ratten

Nach Untersuchungen von HAMMETT (11) steigt der Calciumgehalt in der Knochenasche wachsender Ratten bis zu einem Grenzwert an, der etwa mit dem 75. Lebenstag erreicht wird. Der Anstieg zwischen dem 23. und 75. Lebenstag beträgt 0,7 bis rund 1,2% der Asche. In den folgenden

75 Tagen, also bis zum 150. Tag, ist nur noch ein geringer, von HAMMETT (11) nicht mehr als sicher angesehener Anstieg zu verzeichnen.

Der Autor schließt aus diesen Befunden, daß der Calciumanstieg in der Knochenasche etwa mit dem 75. Lebenstag - einem Alter, in dem auch die Pubertätszeit zu Ende sei - zum Stillstand kommt.

Gleichzeitige Untersuchungen des Phosphat-Gehaltes ergaben eine rückläufige Tendenz. Das Calcium-Phosphor-Verhältnis wird von HAMMETT (11) also inkonstant gefunden.

Aus diesen Befunden wäre zu folgern, daß sich die chemische Form, in der das Calcium im Knochen vorliegt, (Hydroxylapatit?) im Laufe des Wachstums ändert.

Den Ergebnissen HAMMETTs (11) stehen Befunde von HOWLAND und Mitarbeitern (14) gegenüber, die Menschenknochen von Kindern und Erwachsenen, sowie Rattenknochen verschieden alter Versuchstiere untersuchten und fanden, daß das Calcium/Phosphor-Verhältnis während des ganzen Lebens konstant sei.

Zu einem ähnlichen Schluß gelangen SCHMIDT und GREENBERG (38), die in der Zusammensetzung der Knochenasche zwar geringfügige Schwankungen, doch keine Veränderungen im Sinne von HAMMETT (11) angeben.

FLASCHENTRÄGER-LEHNARTZ (9) geben darüber hinaus an, daß die Zusammensetzung der Asche von Knochen verschiedener Tierarten kaum Unterschiede zeige. Sie geben für Menschenknochen 36,4, Ochsenknochen 36,4 und Gänseknochen 36,2% Calcium der Asche an.

MORGILUS (30) findet in der Knochenasche der Kuh und des Hasen 36,1 bzw. 36,3 % Calcium, beim Hund 35,7 und beim Huhn 37,2 %.

Über die Zunahme der mineralischen Substanz im Gesamtknochen wachsender Individuen finden sich übereinstimmende Angaben bei FLASCHENTRÄGER - LEHNARTZ (9) und SCHMIDT und GREENBERG (38).

2) EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Der Calcium-Gehalt der Knochenasche wurde flammenphotometrisch (36) und titrimetrisch (4) in Femur, Tibia und Fibula (Kompakta) und den Wirbeln (Spongiosa) bestimmt.

Mit Hilfe von Asche- und Trockengewicht wurde auf den Gesamtknochen umgerechnet.

2.1) Tiermaterial und Futter

Es wurden 37 weiße Ratten folgender Altersklassen untersucht:

- 6 drei Wochen alte Tiere,
- 6 fünf Wochen alte Tiere,
- 5 neun Wochen alte Tiere,
- 5 vierzehn Wochen alte Tiere,
- 5 achtzehn Wochen alte Tiere,
- 5 zweiundzwanzig Wochen alte Tiere und
- 5 sechsundzwanzig Wochen alte Tiere.

Das Futter der Ratten war folgendermaßen zusammengesetzt:

Weizenschrot 1 Gewichtsteil,
Haferflocken 1 Gewichtsteil,
Milchpulver 0,5 Gewichtsteile,
Trockenhefe 0,1 Gewichtsteile und
Salzmischung 0,1 Gewichtsteile.

Als Salzmischung verwendeten wir die von McCOLLUM und SIMMONDS (29) angegebene Zusammenstellung:

Calcium-lactat	130,0,
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \times \text{H}_2\text{O}$	54,0,
K_2HPO_4	95,4,
NaCl	17,3,
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	34,7,
MgSO_4	36,6 und
Eisen-III-citrat $\times 6\text{H}_2\text{O}$	11,8 Gewichtsteile.

2.2) Knochenaufbereitung.

Die getöteten und ausgeweideten Tiere werden über Nacht eingefroren und anschließend in alkalisch gemachtem aqua dest. (NaOH) etwa 90 Mi-

nuten gekocht. Danach lassen sich die Weichteile mit einer Handbürste entfernen. Nach gründlichem Abspülen (abwechselnd mit 0,01 m-HCl und aqua dest.) und einstündigem Trocknen bei 90-100°C schließt sich eine trockene Veraschung bei 600°C im Muffelofen an. Diese ist in der Regel über Nacht beendet. Die veraschten Knochen werden anschließend pulverisiert.

2.3) Flammenphotometrische Bestimmung

2.3.1) Prinzip:

Pulverisierte Knochenasche wird in HCl gelöst, das Phosphat in azetat-gepufferter Lösung mit FeCl_3 gefällt, überschüssiges Eisen als Ferriazetat niedergeschlagen und das Calcium im Filtrat flammenphotometrisch bestimmt.

2.3.2) Reagenzien:

Acid. acet. glac. (96%, D 1,06)

0,01 m-HCl

m-HCl

Liquor ammon. caust. (24,03% NH_3 , D 0,91)

Liquor ferri sesquichl. (10% Fe D 1,28) für chromat. Zwecke.

0,01 m- NH_4OH

m- NH_4OH

CaCO_3 , durch Umkristallisieren besonders gereinigt.

2.3.3) Lösungen:

1. Ammoniumacetatpuffer: 59,02 ml Acid. acet. glac. werden mit 38,9 ml Liquor ammon. caust. vorsichtig versetzt, abgekühlt und mit aqua dest. ad 1000 ml aufgefüllt. Der Puffer enthält (etwa) 1 mg-Äquivalent CH_3COOH und 0,5 mg-Äquivalent NH_4OH im Milliliter.
2. Eisenchlorid-Lösung: Die Lösung wird durch Verdünnen von 72,7 ml Liquor ferri sesquichlorati mit aqua dest. ad 1000 ml bereitet. Sie enthält (etwa) 0,5 mg-Äquivalent FeCl_3 im Milliliter.

3. Eichlösung: Calcium, eingewogen als Carbonat (z.B. 17 mg/1000 ml),
HCl, 1 mg-Äquivalent/300 ml Eichlösung,
0,01 m-NH₄OH, zum Einstellen des pH-Wertes,
NH₄Cl, 0,5 mg-Äquivalent/300 ml Eichlösung,
CH₃COOH, 0,84 mg-Äquivalent/300 ml Eichlösung.

Zur Herstellung der Eichlösung wird der CaCl₂ in etwa 100 ml aqua dest. aufgeschwemmt und mit HCl versetzt. Nach vollständiger Auflösung wird der pH-Wert mit NH₄OH vorsichtig (!) auf 7,00 eingestellt, NH₄Cl und CH₃COOH zugegeben und zum Endvolumen (z.B. 5000 ml) aufgefüllt. Die Calcium-Konzentration der Eichlösung wird der Analysenlösung (deren annähernde Gehalte sich in einem Vorversuch ermitteln läßt) auf etwa 1 mg/1000 ml genau angepaßt.

1.3.4) Bestimmung

Etwa 15 mg pulverisierte Knochenasche werden in einen 200 ml Erlenmeyerkolben gebracht, mit 1 ml m-HCl versetzt und solange vorsichtig geschüttelt, bis alle Asche gelöst ist. Nach Auffüllen auf etwa 150-200 ml mit aqua dest. wird der pH-Wert mit 0,01 m-NH₄OH auf 7,00 eingestellt. Die neutrale Lösung wird mit je 1 ml FeCl₃-Lösung und Acetatpuffer tropfenweise unter Umschwenken versetzt; sodann wird kurz aufgeköcht, nach dem Abkühlen ad 300 ml aufgefüllt, filtriert und das Calcium im Filtrat flammenphotometrisch bestimmt.

2.3.5) Messung und Berechnung der Ergebnisse

Zur Messung verwenden wir das Spektralphotometer PMQ II der Firma Carl Zeiss mit Flammenzusatz. Das Gerät wird mit Wasserstoff-Sauerstoff betrieben. Die Anzeige des verstärkten Photostromes erfolgt direkt. Kurzzeitige Schwankungen werden durch eine 20 sec-Dämpfung ausintegriert. Die Ermittlung des Leerwertes (Flammenuntergrund) wird durch Zerstäubung von mit Ionenaustauschern gereinigtem Wasser vorgenommen. Dieses findet auch als Lösungsmittel für die Analysen- und Eichlösung Verwendung. Die Messung erfolgt bei einer Spaltbreite von 0,05 mm und bei der Wellenlänge 422,7 m.µ. Wir zerstäuben die Lösungen in der Reihenfolge:
Wasser, Analyse, Eichlösung.

Zur Berechnung der Ergebnisse wird keine Eichkurve verwendet, sondern die Formel:

$$\text{Ca}(\% \text{ der Asche}) = \frac{\text{Nettoanz.d. Analysenl.} \times \text{Konz.d. Eichl. (i. mg/100 ml)} \times 300}{\text{Nettoanz. d. Eichlösung} \times \text{Einwaage (in mg)}} \%$$

da der Quotient Nettoanzeige/Konzentration konstant ist.

2.4) Komplexometrische Methode

2.4.1) Prinzip:

Zur Bestimmung wird das in hoher Konzentration störende Phosphat mit FeCl_3 gefällt, im Filtrat vorliegendes Calcium an Natriumäthylendiamintetraacetat komplex gebunden und der Umschlagspunkt durch den freien Calcium anzeigenden Indikator Murexid sichtbar gemacht.

2.4.2) Reagenzien:

Acid. acet. glac. (96 %, D 1,06)

0,01 m-HCl

m-HCl

Liquor ammon. caust. (24,03 % NH_3 , D 0,91)

Liquor ferri sesquichlor. (10% Fe, D 1,28) für chromat. Zwecke.

0,01 m- NH_4OH

m- NH_4OH

m-NaOH

Na_2S -Lösung, gesättigt

0,1 m-Komplexon III (Titriplex III ® Merck)

Murexid, 0,2% mit NaCl gemischt.

2.4.3) Bestimmung:

Die Phosphatfällung erfolgt in der gleichen Weise wie bei der flammphotometrischen Methode unter 2.3.4) angegeben. Zu 200 ml des Filtrates werden einige Tropfen einer gesättigten Natriumsulfidlösung (Maskierung von Schwermetallspuren) zugesetzt. Durch Zugabe von m-NaOH (etwa 4 ml) wird auf pH-12 eingestellt und bis zur kräftigen Rotfärbung Murexid als Indikator zugesetzt. Jetzt kann mit 0,1 m-Komplexon III bis zum Umschlag nach purpur titriert werden.

2.4.4) Berechnung:

1 ml 0,1 m-Komplexon III ist 4,008 mg Calcium äquivalent.
Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$\text{Ca (\% der Asche)} = \frac{\text{verbr. ml Komplexon III} \times 601,2}{\text{Einwaage (in mg)}}$$

3) ERGEBNISSE

Tabelle 1 - 7 gibt die in der Asche von Kompakta und Spongiosa ermittelten Calcium-Gehalte der verschiedenen Altersklassen, die arithmetischen Mittelwerte, die Streuung σ der Einzelbestimmung und die Streuung m des arithmetischen Mittelwertes wieder. σ ist berechnet nach der Formel

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - M)^2}{n-1}}$$

(48), wobei x_i die Einzelbestimmung, M den arithmetischen Mittelwert der Altersklasse und n den zahlenmäßigen Umfang der Einzelbestimmungen bedeutet. σ berücksichtigt sowohl die methodischen als auch die tierspezifischen Schwankungen.

Die mittlere Abweichung m des Mittelwertes ergibt sich aus der Beziehung

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

(48), und stellt ein Maß für die Reproduzierbarkeit des Mittelwertes dar.

Die Streubereiche σ und m werden von rund 3 % aller entsprechend ermittelten Werte überschritten. Die Überschreitungswahrscheinlichkeit kann durch Erweiterung der Streubereiche in dem für erforderlich gehaltenen Maße verkleinert werden.

Tabelle 1:

Calcium-Gehalt (%) der Knochenasche 3 Wochen alter Versuchsratten.

Tier Nr.	Gewicht (g)	Kompakta		Spongiosa	
		fla +)	tit +)	fla	tit
1	22	36,5	36,3	36,6	36,4
		36,4	36,6		
2	17	36,6	36,7	36,4	36,4
3	20	36,8	36,2	36,0	36,2
4	23	36,4	36,4	36,8	36,3
				36,4	36,3
5	22	36,9	36,7	36,6	36,3
		36,7	36,8		
6	26	36,2	36,0	36,3	36,3
		36,3	36,3	36,2	36,2
M:		36,5(3)	36,4(9)	36,3(7)	36,2(7)
σ:		<u>±</u> 0,24	<u>±</u> 0,27	<u>±</u> 0,24	<u>±</u> 0,07
m:		+ 0,08	+ 0,09	+ 0,08	+ 0,02

+) fla = flammenphotometrisch, tit = titrimetrisch bestimmt.

Tabelle 2:

Calcium-Gehalt (%) der Knochenasche 5 Wochen alter Versuchsratten.

Tier Nr.	Gewicht (g)	Kompakta		Spongiosa	
		fla	tit	fla	tit
1	66	36,4	36,4	36,2	36,1
		36,4	36,3	36,1	35,8
		36,6	36,6	36,3	36,3
2	68	36,3	36,3	36,6	36,6
		36,4	36,6	36,2	36,6
		36,6	36,7	36,4	36,2
3	61	36,7	36,5	36,6	36,4
		36,4	36,4	36,4	36,3
		36,2	36,0	36,3	36,4
4	60	36,1	36,2	36,5	36,4
		36,5	36,3	36,3	36,5
		36,5	36,3	36,1	36,6
5	59	36,7	36,7	36,1	36,3
		36,6	36,6	36,2	36,4
		36,3	36,3	36,3	36,4
6	61	36,4	36,7	36,2	36,3
		36,8	36,4	36,3	36,4
		36,5	36,5	36,5	36,4
	M:	36,4(7)	36,4(4)	36,3(1)	36,3(6)
	σ:	$\pm 0,18$	$\pm 0,20$	$\pm 0,16$	$\pm 0,20$
	m:	$\pm 0,04$	$\pm 0,05$	$\pm 0,04$	$\pm 0,05$

Tabelle 3: Calcium-Gehalt (%) der Knochenasche 9 Wochen alter Versuchsratten

Tier Nr.	Gewicht (g)	Kompakta		Spongiosa	
		fla	tit	fla	tit
1	121	36,2	36,3	36,2	36,2
		36,6	36,4	36,4	36,5
		36,3	36,5	36,5	36,5
2	157	36,0	36,4	36,0	36,1
		36,4	36,4	36,0	36,0
		36,3	36,3	36,3	36,4
3	157	36,5	36,6	36,4	36,5
		36,8	36,7	36,2	36,5
		36,4	36,6	36,7	36,7
4	181	36,1	36,6	36,3	36,4
		36,5	36,4	36,6	36,4
		36,3	36,3	36,6	36,3
5	160	36,1	36,6	36,5	36,6
		36,6	36,5	36,7	36,7
		36,4	36,4	36,7	36,7

M: 36,3(7) 36,4(7) 36,4(1) 36,4(3)

σ : $\pm 0,22$ $\pm 0,13$ $\pm 0,24$ $\pm 0,22$

m: $\pm 0,06$ $\pm 0,03$ $\pm 0,06$ $\pm 0,06$

Tabelle 4: Calcium-Gehalt (%) der Knochenasche 14 Wochen alter Versuchsratten

Tier Nr.	Gewicht (g)	Kompakta		Spongiosa	
		fla	tit	fla	tit
1	199	36,2	36,6	36,4	36,2
		36,4	36,4	36,4	36,3
		36,6	36,5	36,3	36,3
2	209	36,4	36,3	36,6	36,5
		36,5	36,8	36,8	36,8
		36,3	36,4	36,7	36,9
3	194	36,5	36,6	36,6	36,6
		36,6	36,5	36,7	36,8
		36,6	36,6	36,6	36,7
4	223	35,9	35,9	36,3	36,3
		36,1	36,0	36,4	36,4
		36,0	36,0	36,4	36,5
5	231	36,3	36,2	36,4	36,1
		36,0	36,4	36,3	36,3
		36,3	36,2	36,4	36,1
	M:	36,3(1)	36,3(6)	36,4(9)	36,4(5)
	♂:	$\pm 0,23$	$\pm 0,26$	$\pm 0,16$	$\pm 0,26$
	m:	$\pm 0,06$	$\pm 0,07$	$\pm 0,04$	$\pm 0,07$

Tabelle 5: Calcium-Gehalt (%) der Knochenasche 18 Wochen alter Versuchsratten

Tier Nr.	Gewicht (g)	Kompakta		Spongiosa	
		fla	tit	fla	tit
1	216	36,5	36,4	36,6	36,6
		36,5	36,5	36,5	36,4
		36,5	36,1	36,2	36,5
2	219	36,2	36,4	36,2	36,3
		36,3	36,0	36,5	36,5
		36,1	36,2	36,5	36,6
3	247	36,4	36,4	36,2	36,3
		36,4	36,3	36,3	36,5
		36,2	36,4	36,5	36,6
4	272	36,2	36,7	36,2	35,9
		36,3	36,5	36,1	35,9
		36,5	36,4	35,9	35,9
5	284	36,1	36,1	36,3	36,2
		36,2	36,3	36,4	36,2
		36,1	36,4	36,3	36,2
	M:	36,3(0)	36,3(4)	36,3(1)	36,3(1)
	σ :	$\pm 0,15$	$\pm 0,19$	$\pm 0,19$	$\pm 0,25$
	m:	$\pm 0,04$	$\pm 0,05$	$\pm 0,05$	$\pm 0,07$

Tabelle 6: Calcium-Gehalt (%) der Knochenasche 22 Wochen alter Versuchsratten

Tier Nr.	Gewicht (g)	Kompakta		Spongiosa	
		fla	itt	fla	tit
1	202	36,2	36,1	36,5	36,5
		36,3	36,2	36,6	36,5
		36,0	36,1	36,1	36,5
2	222	36,4	36,2	36,1	36,5
		36,2	36,4	36,4	36,2
		36,0	36,3	36,4	36,4
3	264	36,7	36,5	36,4	36,2
		36,7	36,9	36,1	36,4
		36,4	36,7	36,3	36,3
4	296	36,3	36,2	35,8	35,9
		36,2	36,4	35,7	35,7
		36,3	36,3	35,9	36,0
5	309	36,1	36,4	36,6	36,4
		36,4	36,3	36,5	36,4
		36,4	36,4	36,5	36,5

M₂: 36,3(1) 36,3(6) 36,2(6) 36,2(9)

σ : $\pm 0,17$ $\pm 0,22$ $\pm 0,29$ $\pm 0,25$

m₂: $\pm 0,05$ $\pm 0,06$ $\pm 0,08$ $\pm 0,06$

Tabelle 7 $\frac{1}{2}$ Calcium-Gehalt (%) der Knochenasche 26 Wochen alter Versuchsratten

Tier Nr.	Gewicht (g)	Kompakta		Spongiosa	
		fla	tit	fla	tit
1	213	36,4	36,5	36,1	36,0
		36,4	36,3	35,9	35,9
		36,4	36,4	36,0	36,0
2	281	36,7	36,4	35,9	35,9
		36,4	36,3	36,3	36,0
		36,4	36,4	36,3	36,2
3	301	36,6	36,4	36,4	36,3
		36,5	36,2	36,4	36,2
		36,3	36,3	36,3	36,3
4	302	36,7	36,6	36,5	36,5
		36,6	36,7	36,8	36,5
		36,5	36,6	36,5	36,6
5	272	36,5	36,7	36,8	36,7
		36,3	36,8	36,9	36,9
		36,4	36,8	36,8	36,7
	M:	36,4(6)	36,4(9)	36,3(9)	36,3(1)
	σ :	$\pm 0,13$	$\pm 0,19$	$\pm 0,33$	$\pm 0,32$
	m:	$\pm 0,03$	$\pm 0,05$	$\pm 0,09$	$\pm 0,08$

Wie ersichtlich, bestehen zwischen den flammenphotometrisch und komplexometrisch ermittelten Werten nur geringfügige Differenzen. Wir entscheiden die Frage, ob die Unterschiede zufällig, oder statistisch gesichert sind, durch eine Signifikanzprüfung nach der Formel

$$\pm T \sqrt{\frac{m_1^2 + m_2^2}{n_1 + n_2}} \quad (48),$$

worin T einen vom Umfang der zu vergleichenden Meßreihen abhängigen Faktor für eine Signifikanzwahrscheinlichkeit von 99,73% und m_1 bzw. m_2 die mittleren Abweichungen (siehe oben) der zu vergleichenden Mittelwerte bedeutet. Von statistisch gesicherten Unterschieden zwischen den flammenphotometrisch und komplexometrisch ermittelten Ergebnissen kann nur dann gesprochen werden, wenn die Differenz vergleichbarer Mittelwerte ihrem absoluten Betrag nach größer als der den Zufallsbereich umfassende Wurzelausdruck ist.

In den Figuren 1 und 2 ist die Signifikanzprüfung für die zwischen den flammenphotometrisch und titrimetrisch ermittelten Werten bestehenden Abweichungen graphisch dargestellt.

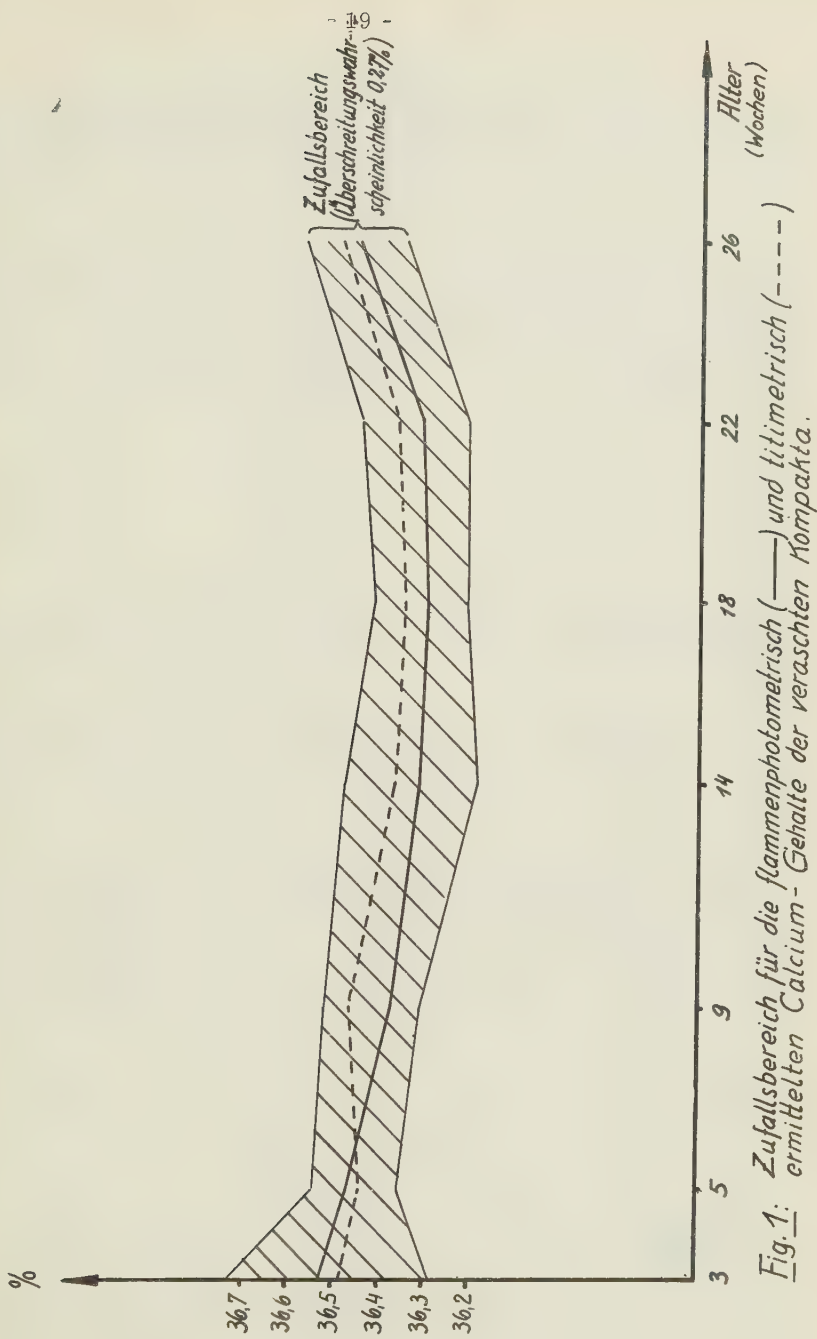


Fig. 1: Zufallsbereich für die flammenphotometrisch (—) und titrimetrisch (----) ermittelten Calcium-Gehalte der veraschten Nompakta.

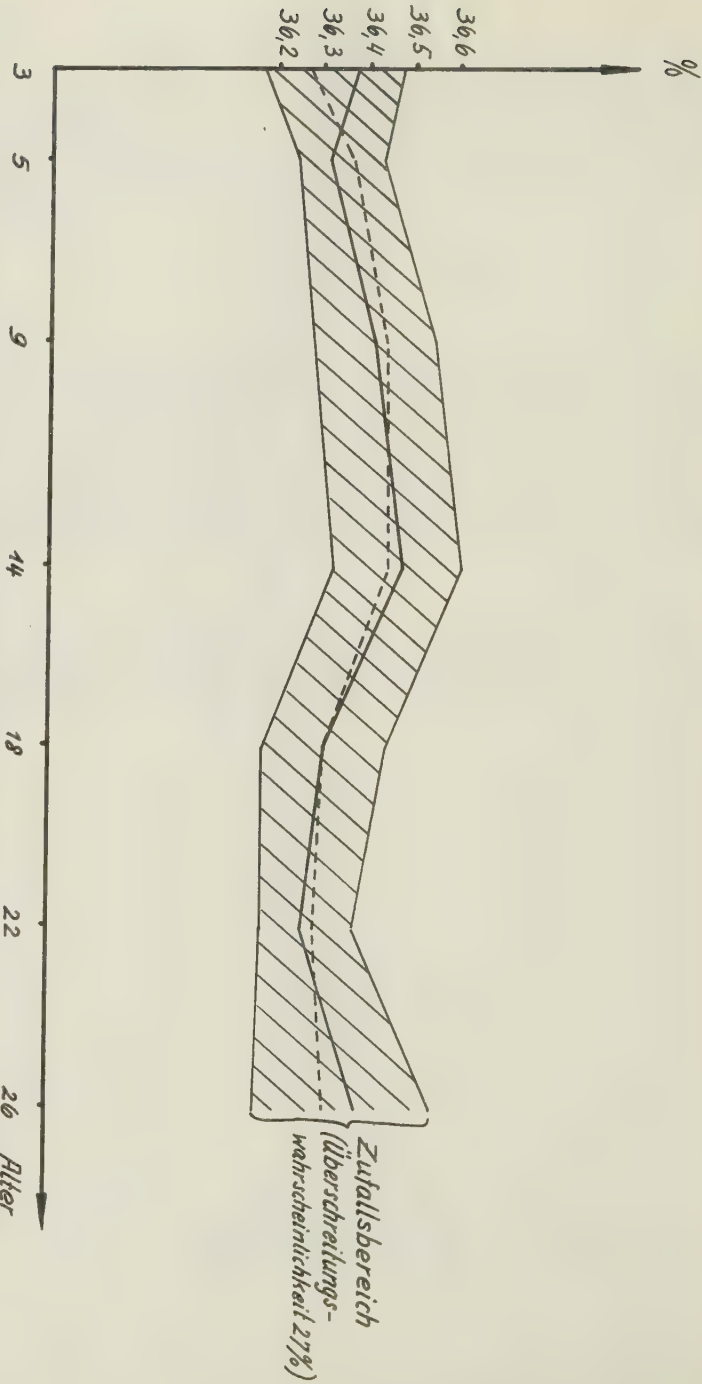


Fig. 2: Zufallsbereich für die flammenphotometrisch (—) und titrimetrisch (---) ermittelten Calcium-Gehalte der veraschten Spongiosa.

Aus den Figuren 1 und 2 ist ersichtlich, daß die Differenzen innerhalb des Zufallsbereiches liegen und damit nicht signifikant sind, d.h. wir ermitteln flammenphotometrisch und titrimetrisch dieselben Ergebnisse.

Eine weitere Frage ist, ob zwischen den Aschewerten von Kompakta und Spongiosa echte Unterschiede bestehen. Die Frage wird gleichfalls durch eine Signifikanzprüfung entschieden, die in Figur 3 graphisch für die flammenphotometrisch ermittelten Werte wiedergegeben ist. (Wegen der oben nachgewiesenen Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden entfällt eine Prüfung der titrimetrisch ermittelten Werte.)

Figur 3 auf Seite 22!

Wir sehen, daß auch hier keine statistisch gesicherten Unterschiede bestehen und kommen zudem Schluß, daß der Calcium-Gehalt der Asche von Kompakta und Spongiosa gleich ist.

Zur Beantwortung der Frage, ob zwischen dem Calcium-Gehalt der verschiedenen Altersklassen gesicherte Unterschiede bestehen, wird jede Altersklasse gegenüber allen übrigen auf Signifikanz geprüft.

Die Auswertung für die flammenphotometrisch in der Kompakta ermittelten Befunde ist in Tabelle 8 enthalten. (Ein Vergleich der flammenphotometrisch bestimmten Spongiosawerte und der titrimetrisch gewonnenen Werte beider Fraktionen entfällt, wegen der bereits gesicherten Übereinstimmung der Analysenmethoden bzw. von Kompakta und Spongiosa.)

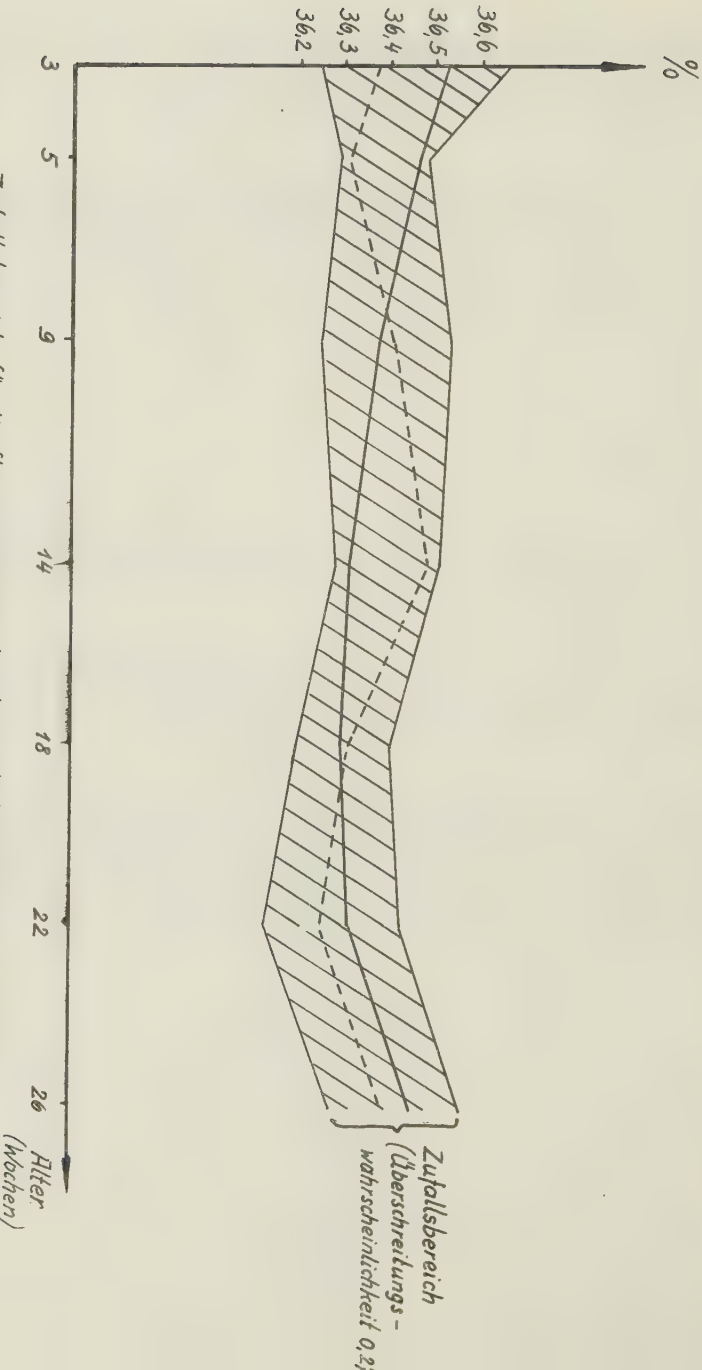


Fig. 3: Zufallsbereich für die flammenphotometrisch ermittelten Calcium-Gehalte der Asche in Kompatia (—) und Spongiosa (---)

Tabelle 8:

Prüfung der flammenphotometrisch in der Kompakta ermittelten Calcium-Gehalte aller untersuchter Altersklassen auf Signifikanz.

Altersvergleich (Wochen)			Diff. d. Mittelw. (%Ca)	Zufallsbereich (%Ca)	Beurteilung
3	mit	5	0,06	0,30	nicht signifikant +)
3	mit	9	0,16	0,34	
3	mit	14	0,22	0,34	
3	mit	18	0,23	0,30	
3	mit	22	0,22	0,32	
3	mit	26	0,07	0,28	
5	mit	9	0,10	0,21	
5	mit	14	0,16	0,21	
5	mit	18	0,17	0,21	
5	mit	22	0,16	0,19	
5	mit	26	0,01	0,15	
9	mit	14	0,06	0,28	
9	mit	18	0,07	0,24	
9	mit	22	0,06	0,26	
9	mit	26	0,09	0,22	
14	mit	18	0,01	0,24	
14	mit	22	0,00	0,26	
14	mit	26	0,15	0,22	
18	mit	22	0,01	0,21	
18	mit	26	0,16	0,19	
22	mit	26	0,15	0,19	

Die Tabelle zeigt, daß die zwischen den einzelnen Altersklassen bestehenden Unterschiede innerhalb des Zufallsbereichs liegen, d.h. der Calcium-Gehalt der Asche von Kompakta und Spongiosa 3-26 Wochen alter Ratten ist konstant.

Er ist in Tabelle 9 zusammengefaßt niedergelegt.

+) mit einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von 0,27 %.

Tabelle 9: Mittlerer Calcium-Gehalt der Knochenasche (%) 3 - 26 Wochen alter Versuchsratten.

Analysengut und Bestimmungsmeth.		M	σ
Kompakta	fla	36,3(9)	$\pm 0,2(1)$
	tit	36,4(2)	$\pm 0,2(1)$
Spongiosa	fla	36,3(6)	$\pm 0,2(4)$
	tit	36,3(4)	$\pm 0,2(5)$
Kompakta ,	fla + tit	36,4(1)	$\pm 0,2(1)$
Spongiosa ,	fla + tit	36,3(5)	$\pm 0,2(4)$
Komp. + Spong.,	fla + tit	36,3(8)	$\pm 0,2(3)$

Aus der Tabelle geht hervor, daß der Calcium-Gehalt der Knochenasche 3 - 26 Wochen alter, unter unseren Bedingungen gehaltener Versuchsratten, mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,73% (Streubereich = 3σ), $36,38 \pm 0,69\%$ beträgt.

Eine Umrechnung der flammenphotometrisch bestimmten Calcium-Gehalte von Kompakta und Spongiosa auf die Trockensubstanz des nicht entfetteten Gesamtknochens an Hand der Trocken- und Aschegewichte, ergibt die in Tabelle 10 aufgeführten und in Figur 4 dargestellten Werte.

Tabelle 10: Mittlerer Calciumgehalt (%) von Kompakta und Spongiosa, berechnet auf den Gesamtknochen. +)

Alter (Wochen)	Kompakta fla	Spongiosa fla
3	22,2 (3) $\pm$ 0,05	19,5 (3) $\pm$ 0,05
5	21,6 (2) $\pm$ 0,03	19,5 (3) $\pm$ 0,02
9	22,5 (5) $\pm$ 0,04	20,0 (8) $\pm$ 0,03
14	23,1 (3) $\pm$ 0,03	21,9 (3) $\pm$ 0,02
18	23,3 (5) $\pm$ 0,03	22,2 (8) $\pm$ 0,04
22	24,6 (2) $\pm$ 0,03	22,8 (1) $\pm$ 0,05
26	23,6 (5) $\pm$ 0,02	22,3 (1) $\pm$ 0,06

+) Als Streuungsmaß ist m (siehe S. 13) gewählt worden.

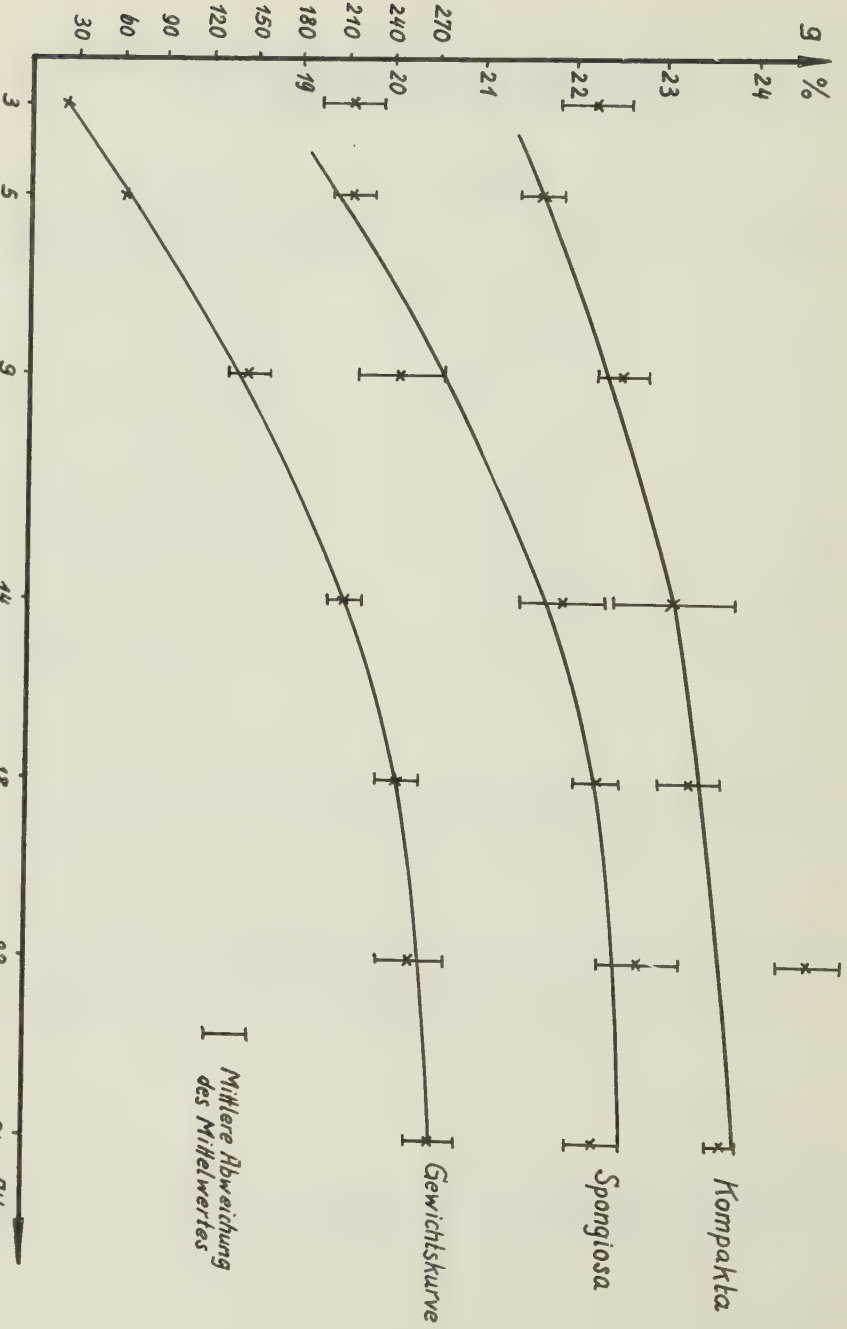


Fig 4: Calcium-Gehalt des Gesamtschneiders u. Lebendgewicht von Ratten versch. Alters.

Die umgerechneten Werte führen zu dem Schluß, daß der Calcium-Gehalt des Gesamtknochens wachsender Ratten mit zunehmendem Alter und Körpergewicht ansteigt.

4) DISKUSSION DER METHODEN UND ERGEBNISSE

Die von BORCHERT (4) beschriebene komplexometrische Calciumbestimmungsmethode ergab wegen des hohen Phosphatgehaltes der Knochenasche einen schleppenden Umschlag (undeutliche Erkennung des Äquivalenzpunktes) und war deshalb nur nach vorheriger Entfernung des Phosphats anwendbar. Sie verliert dadurch an Einfachheit.

Bei der flammenphotometrischen Methode (36) erwies sich die beschränkte Haltbarkeit der Eichlösung, die wegen einsetzenden Pilzwachstums alle 2-3 Wochen erneuert werden mußte, als ein gewisser Nachteil. Dagegen ist die schnelle Durchführbarkeit der Methode hervorzuheben; ebenso ihre Überlegenheit in der Erfassung kleiner Calcium-Mengen.

Der ermittelte Calcium-Gehalt von $36,3 (8) \pm 0,69\%$ der Asche befindet sich in guter Übereinstimmung mit dem bei FLASCHENTRÄGER-LEHNARTZ (9) angegebenen Werten für Menschenknochen, Ochsenknochen und Gänseknochen. Ein Vergleich mit diesen Angaben ist insofern erlaubt, als dort gleichzeitig bemerkt wird, daß der Calcium-Gehalt der Asche verschiedener Tierspezies nur geringfügige Schwankungen aufweist. Diese Ansicht wird gestützt durch die Ergebnisse von MORGULIS (30).

Im Gegensatz dazu stimmen wir nur bedingt mit den Angaben von HAMMETT (11) überein, dessen Befunde bei Rattenknochen - in Abhängigkeit vom Alter - teilweise über und teilweise unter unseren Ergebnissen liegen. Eine Altersabhängigkeit stellen wir nicht fest (siehe Tabelle 8). Es sind zwar gewisse Schwankungen zwischen den Altersklassen vorhanden, die jedoch im Zufallsbereich liegen, und damit keine echten Unterschiede darstellen.

In dem Bemühen um eine Klärung der Differenzen prüften wir zuerst, ob sie nicht durch fütterungsbedingte oder methodische Faktoren unsererseits (trotz Ermittlung mit 2 voneinander unabhängigen Bestimmungsverfahren) verursacht sein könnte.

Diätetische Momente glauben wir ausschliessen zu können, da sich selbst bei rachitischen Tieren, wie aus Untersuchungen von HOWLAND und Mitarbeitern (14) hervorgeht, die chemische Zusammensetzung der Knochenminerale nicht ändert. Sie ist auch nach SCHMIDT und GREENBERG (38) als konstant anzusehen. Eine inkonstante Aschenzusammensetzung ist aber zur Erklärung der HAMMETT'schen Befunde unerlässlich. Sie wird auch von HAMMETT (11) vorausgesetzt. Er befindet sich dabei im Widerspruch zu HOWLAND (14), der sowohl beim Menschen als auch bei Ratten ein altersunabhängiges, konstantes Calcium-Phosphor-Verhältnis ermittelt.

Aus Untersuchungen am hiesigen Institut (37) ist uns zwar bekannt, daß bei sehr alten Ratten (bedeutend älteren als den von HAMMETT (11) und uns untersuchten) der Calcium-Gehalt der Knochenasche Werte von 38-39% annehmen kann. Die Erklärung dafür dürfte allerdings eine auch makroskopisch erkennbare teilweise Verkalkung des Periosts sein, deren mineralische Zusammensetzung natürlich nicht mit der der Knochen übereinzustimmen braucht.

Auch durch kritische Betrachtung der Streuung unserer Ergebnisse läßt sich eine Übereinstimmung mit HAMMETT (11) nicht herbeiführen. Die Streuung liegt nämlich in derselben Größenordnung wie die für die flammphotometrische Methode an sich ermittelte Streuung (36). Es muß sich also in unserem Falle um eine nahezu reine Methodenstreuung und nicht um eine im Analysengut vorhandene Variabilität handeln.

Zum Schluß erhebt sich die Frage, ob eine kritische Betrachtung des Streubereiches der von HAMMETT (10) verwendeten Methode nicht zur Klärung der Diskrepanz führen würde.

5) ZUSAMMENFASSUNG

- 1) Bei 37 wachsenden Ratten wurde der Calcium-Gehalt in der Asche von Femur, Tibia und Fibula (Kompakta) und den Wirbeln (Spongiosa) untersucht.
 - 2) Die Bestimmung erfolgte flammenphotometrisch und -unabhängig davon komplexometrisch unter Vergleich beider Methoden.
 - 3) Die Aschewerte wurden an Hand von Asche- und Trockengewicht auf den Gesamtknochen umgerechnet.
 - 4) Nach statistischer Auswertung der Ergebnisse wurden folgende Befunde erhoben:
 - 4.1) Die Ergebnisse beider Methoden stimmen überein.
 - 4.2) Für die Bestimmung kleiner Calciummengen und zur Durchführung von Reihenanalysen ist die flammenphotometrische Methode besser geeignet.
 - 4.3) Der Calcium-Gehalt der Asche von Kompakta und Spongiosa ist gleich.
 - 4.4) Die Gesamtasche von Kompakta und Spongiosa enthält $36,3 (8) \pm 0,69\%$ Calcium (Wahrscheinlichkeit 99,73%).
 - 4.5) Bei 3-26 Wochen alten Tieren ist der Calciumgehalt der Asche konstant, also altersunabhängig.
 - 4.6) Im Gesamtknochen steigt der Calcium-Gehalt mit zunehmendem Alter und Körpergewicht an.
-

6) LITERATUR

- 1) ALTEN, H., H. WEILAND und E. KNIPPENBERGER:
Biochem. Ztschr. 265, 85 (1933)
- 2) BAKER, G. L. and L. H. JOHNSON:
Analyt. Chem. 26, 465 (1954)
- 3) BARNES, R. B., D. RICHARDSON, J. W. BERRY and
R. L. HOOD: Industr. Eng. Chem. 17, 605 (1954)
- 4) BORCHERT, O.: Chem. Techn. 8, 337 (1956)
- 5) COOLEY, M. L.: Cereal. Chem. 30, 39 (1953)
- 6) DIAMOND, J. J. and L. BEAN:
Analyt. Chem. 25, 1825 (1953)
- 7) DWORZAK, E. und W. REICH-ROHRWIG:
Zeitschr. analyt. Chem. 86, 98 (1931)
- 8) FIELDS, M. et al.: Soil. Sci. 72, 219 (1951)
- 9) FLASCHENTRÄGER, B. u. E. LEHNARTZ:
"Physiologische Chemie"
Handb. Springer-Verl. Berlin II/1a
702 (1954)
- 10) HAMMETT, F. S.: J. Biol. Chem. 57, 285 (1923)
- 11) HAMMETT, F. S.: J. Biol. Chem. 64, 693 (1925)
- 12) HASLER, A.: Diss. ETH Zürich (1940)
- 13) HERRMANN, A.: "Flammenphotometrie"
Springer-Verlag, Berlin, 1956
- 14) HOWLAND, J. W., K. MARRIOTT and KRAMER:
J. Biol. Chem. 68, 721 (1926)

- 15) HULDT, L.: Ark. Mat. Astr. Fysik 1, 4 (1944)
- 16) JEVINS, A. u. V. GRINSTEINS:
Ztschr. analyt. Chem. 127, 20 (1944)
- 17) JEVINS, A. und V. GRINSTEINS:
Ztschr. analyt. Chem. 124, 288 (1942)
- 18) KARAOGLANOV, Z.: Ztschr. analyt. Chem. 124, 102 (1942)
- 19) KICK, H.: Ztschr. Pflanzenernährung, Düng. u. Bodenkunde 60, 149 (1953)
- 20) KINGSLEY, G. R. and R. R. SCHAFFERT:
Science (Lancaster, Pa.) 116, 359 (1952)
- 21) KISSER, K.: Mikrochem. 1, 25 (1923)
- 22) KÖHNLEIN J. und E. K. LÜCKE:
Ztschr. Pflanzenernähr. Düng. u. Bodenkunde 57, 114 (1952)
- 23) KRAMER, B. und F. F. TISDALL:
J. Biol. Chem. 56, 439 (1923)
- 24) KUEMMEL, D. F. and H. L. KARL:
Analyt. Chem. 26, 386 (1954)
- 25) LEHMANN, H. und W. FRALOW:
Tonind. Ztg. und Keram. Rdsch. 76, 33 (1953)
- 26) LEYTON, L.: Analyt. Chem. 79, 497 (1954)
- 27) LUCA, H. H. De: Canad. J. Res. (B) 25, 449 (1917)
- 28) MARRIOTT, M. W. and J. HOWLAND:
J. Biol. Chem. 32, 233 (1917)

- 29) McCOLLUM, E. V. and N. SIMMONDS:
J. Biol. Chem. 33, 55 (1918)
- 30) MORGULIS, J.: J. Biol. Chem. 93, 455 (1931)
- 31) MOSHER, R. E., E. J. BIRD and A. J. BOYLE:
Analyt. Chem. 22, 715 (1950)
- 32) MÜLLER, G. O.: "Praktikum der quant. chem. Analyse"
Hirzel-Verl. Leipzig (1957)
- 33) NATELSON, S.: Amer. J. Clin. Path. 20, 463 (1950)
- 34) ROBINSON, P. L. and W. E. SCOTT:
Ztschr. analyt. Chem. 88, 417 (1932)
- 35) SCHARRER, K. und J. JUNG:
Ztschr. Pflanzenernähr., Düng. und Bodenkunde, 67, 240 (1954)
- 36) SCHMID, A. und K. ZIPF:
Biochem. Ztschr. 331, 144 (1959)
- 37) SCHMID, A.: Inst. f. Pharmak. d. Tierärztl. Fakultät
München.
Persönliche Mitteilung.
- 38) SCHMIDT, C. L. A. and D. M. GREENBERG:
Physiol. Rev. 15, 297 (1935)
- 39) SCHUHKNECHT, W.:
Angew. Chem. 50, 299 (1937)
- 40) SCHÜTZ, W.: vet. med. Diss. Giessen (1954)
- 41) SEAY, W. A., O. J. ATTOE and E. TRUOG:
Soil. Sci. 71, 83 (1951)

- 42) SERVIGNE, M.: Chim. Analytique 36, 115 (1954)
- 43) SOBEL, A.E. and S. SKLERSKY:
J. Biol. Chem. 122, 665 (1937)
- 44) STREED, E.R. and U.W. STOLL:
Amer. Soc. Testing Materials, Bull.
April 1953, 58
- 45) STROHMEYER, F.B., B.E. LEACH and R.G. HEATH:
Analyt. Chem. 25, 1935 (1953)
- 46) TÖROCK, T.: Ztschr. analyt. Chem. 119, 120 (1940)
- 47) VALENCIA, R.: Bull. soc. chim. biol. (Paris) 38, 1071
(1956)
- 48) WEBER, E.: "Grundriß d. biol. Statistik"
Fischer-Verlag Jena, 180 (1948)
- 49) ZOELLNER, H.: Zitiert nach HERRMANN
(siehe Literatur 13)

Abschließend danke ich Herrn Professor Dr. K. Zipf
für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit,
die Untersuchungen in seinem Institut durchzuführen.

Herrn Dr. A. Schmid danke ich für die mir erteilten
Ratschläge.

LEBENS LAUF

Ich, Eberhard Schmidt, wurde als Sohn des Universitätsprofessors Dr. med. Ludwig Schmidt und dessen Ehefrau Hildegard geb. Eggeling, am 2.11.1934 zu Würzburg geboren. Im Oktober 1941 fiel mein Vater in Russland. Von 1941-1945 besuchte ich die Volksschule in Würzburg. Bei Kriegsende verzog die Familie nach Haslach i.K. 1945 trat ich in das Schillergymnasium in Offenburg ein, wechselte im Herbst 1949 zum Gymnasium Hausach über, wo ich am 10.4.1954 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1954 begann ich mein Studium an der Medizinischen Fakultät in Freiburg. Im folgenden Wintersemester nahm ich das Studium der Tierheilkunde in München auf. In meinem 6. und 7. Semester studierte ich an der Tierärztlichen Hochschule Wien. Am 23. Februar 1959 legte ich an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München das Staatsexamen ab.

